

甲状腺ホルモンの末梢代謝に関する研究

〔Ⅱ〕末梢血リンパ球のサイロキシン脱ヨード活性

金沢大学小児科学教室（主任：谷口 昂教授）

才 田 耕 基

（昭和54年2月1日受付）

第一編で甲状腺ホルモンの末梢代謝の変動を、 T_4 の脱ヨード系の first step である T_3 及び rT_3 生成系の変動から捉えたが、これまでに *in vitro* における、肝及び腎組織を用いた多くの T_4 代謝の研究が報告されている¹⁾⁻³⁾。それは、これらの臓器が T_4 -monodeiodination の主要な場であることによる。最近、これらの臓器や下垂体細胞に甲状腺ホルモンの特異的結合部位が存在することが明らかにされた⁴⁾⁻⁵⁾。また、Tsaiらは、人末梢血リンパ球の核に T_3 の特異的結合部位を証明し、リンパ球もまた甲状腺ホルモン感受性器官の一つとみなされるようになった⁶⁾。

本稿は、人末梢血リンパ球を用い、臨床的にも比較的簡単におこなえるサイロキシン脱ヨード活性を測定し、正常人、各種甲状腺疾患、下垂体性小人症について、臨床症状との関連、治療による推移を検討した。

対 象

正常人 26 例、甲状腺機能低下症 5 例、TBG 欠損症 1 例、バセドウ病 15 例、下垂体性小人症 10 例の計 57 例である。なお治療による推移をみるため、同一人で反復測定している例を含めると、実際の検体数は 66 となる（表 2 参照）。

方 法

1) 採血

外来受診時、ヘパリン加ディスポ注射器を用い、3 ml 採血した。

2) リンパ球の分離

Böyum⁷⁾の方法に準じて行い、ヘパリン加血 3 ml をポリ採血管中でリンホブレイプ（和光純薬）3 ml の上に重層し、18-20℃、400×G で 30 分間遠心分離した。境界面のリンパ球層をピペットで採取し、生理食塩水

で 3 回洗浄、一検体 2×10^6 コに統一した（単球の混入 10% 程度）。

3) 培養

Eagle のメジウム（富士臓器）200 μ l に、 2×10^6 コのリンパ球を浮遊させ、 $FeSO_4$ 0.01 μ M（10 μ l）を添加し、37℃、5% CO_2 、95% air の存在下に 30 分間 preincubation を行い、これに ^{125}I -thyroxine（NEN 社、20 μ Ci/ml、0.4 γ /ml）を 50 μ l 添加し、 ^{125}I - T_4 の最終濃度が 8 γ /dl となるようにし、2 時間の培養を行った。又、メジウム中に SM100 μ g/ml、PC-G100U/ml を添加した。なお培養には pyrex tube を使用した。

4) T_4 とヨードの分離

培養後直ちに遠心分離し、上清 10 ml をセルロース薄層プレート（フナコシ薬品）にアプライし、n-ブタノール、酢酸、水を 78:5:17 の展開溶媒を用い、cold T_4 、ヨードをマーカーとして、 T_4 とヨードを分離した。乾燥後 2.7% 塩化第二鉄 2N 塩酸溶液、3.5% フェリシアン化カリ溶液、3.8% 亜ヒ酸溶液を 5:5:1 の試薬を用いてそれぞれのスポットを発色させた。本法によれば、ヨード化サイロニンと無機ヨードを同時に検出する利点がある。それぞれのスポットを削りとり、 γ -カウンターで放射活性を測定した。脱ヨード活性（Deiodination Activity D.A. と略す）は便宜的に以下の様に表わした。

$$D.A. = \frac{\text{ヨード分画のカウント数 (I)}}{\text{サイロキシン分画のカウント数 (T}_4\text{)}} \times 100$$

結 果

I 方法論的検討

1. クロマトグラフィーによる T_4 とヨードの分離

Regulation of peripheral thyroxine metabolism. Thyroxine deiodinating activity of lymphocytes *in vitro*. Kohki Saida, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi) School of Medicine, Kanazawa University.

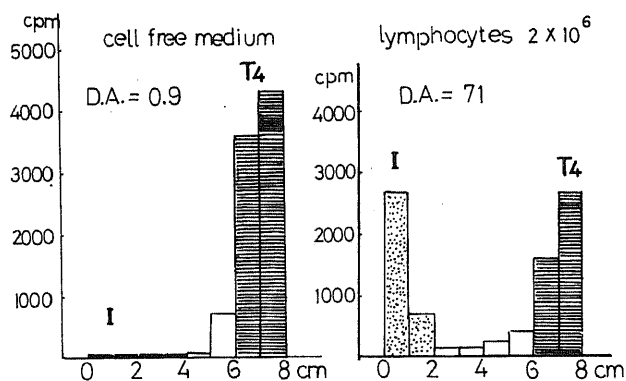


図1 Separation of Iodide from T₄ by Cellulose TLC.

図1は、セルロース薄層プレート1 cm間隔の放射活性を示したもので、T₄はRf = 0.87、ヨードはRf = 0.15と明瞭に分離され、その間に有意の放射活性は見出されなかった。

cell free メジウムではD.A.0.9と殆んど脱ヨード活性はなく、 2×10^6 コのリンパ球を使用した1例ではD.A.74と高値を示した。

2. クロマトグラフィーの再現性 (表1)

当初クロマトグラフィーは1検体2回測定を行ったが、表1のクロマトグラフィーの再現性の結果は変動係数(C.V.) $7.0 \pm 3.7\%$ と再現性の高いことを示し、以後1検体1回測定とした。

3. $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ の自然分解 (図2)

4℃で保存中の $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ は2ヶ月を過ぎる頃より自然分解が高まり、使用に不適当と思われたので使用は2ヶ月以内とした。

4. 脱ヨード反応のtime course (図3)

培養時間設定のためtime courseを検討した。培養開始3時間を過ぎる頃より脱ヨード活性は低下し、5～6時間で再び上昇するパターンを示したため、培養時間を2時間と設定した。

5. Fe^{++} による活性化 (図4)

脱ヨード反応を促進する因子として、 Fe^{++} 、リボフラビンなどが明らかにされている⁹⁾⁻¹⁰⁾が、図4に Fe^{++} のdose-response curveと Fe^{++} 添加による活性の変動を示した。これによると、 $\text{Fe}^{++} 0.01 \mu\text{M}$ の添加でbase lineに影響を及ぼさず、明瞭に活性の上昇を見た。また、 Fe^{++} 添加前ではD.A. 2.8 ± 0.9 (Mean \pm SD $n=10$)と低く、 $0.01 \mu\text{M}$ の添加でD.A. 26 ± 14 (Mean \pm SD $n=26$)と約10倍の上昇を示した。

6. 血清添加の影響

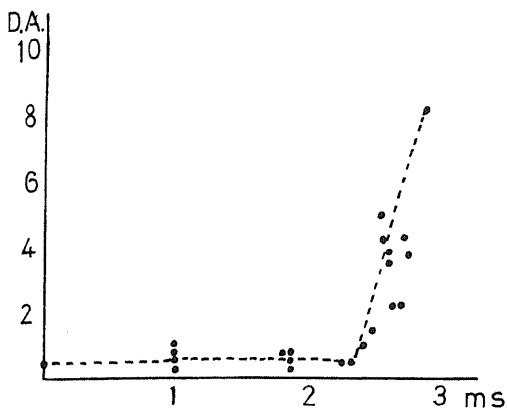
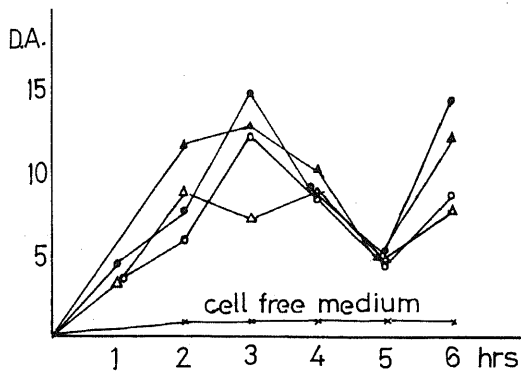
表1 Reproducibility of chromatography

Sample	Iodide/T ₄ Ratio		C.V.
1	12.5	9.4	13.6
2	6.9	7.2	2.1
3	7.0	8.9	12.5
4	12.7	13.7	3.7
5	12.7	10.3	10.4
6	17.6	22.7	12.7
7	5.8	6.0	1.7
8	73.4	72.9	0.3
9	74.5	75.2	0.5
10	77.9	72.5	3.6
11	24.2	21.5	5.9
12	61.6	77.3	11.3
13	29.8	33.1	5.2
14	37.8	49.6	13.5
15	20.2	19.8	1.2
			$7.0 \pm 3.7\%$

メジウムに予め少量の血清を添加するか、10%仔牛血清含有メジウムを使用すると、脱ヨード活性は殆んど零を示し、反応が進まないことが分った。

II 臨床的検討 (表2)

正常人26例のMean \pm SDは 26 ± 14 であった。cell freeの下では1以下であった。甲状腺機能低下症群では、T₄-I $0.8 \gamma/\text{dl}$ 、T₄ $72 \text{ ng}/\text{dl}$ の未治療のク


 図2 Natural deiodination of $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ during storage at 4°C

 図3 Time course of T_4 deiodination

レチン症で D.A.2 と低く、 $l-\text{T}_4$ 治療 2 カ月後 D.A.19 と正常下限に復した。この時点で T_4-I 5.3 γ /dI、 T_3 180 ng/dI で臨床症状も消失していた。また T_4-I 0.3 γ /dI、 T_3 41 ng/dI の一例でも D.A.3 と低値を認めた。 $l-\text{T}_4$ 治療で euthyroid の低下症群では D.A.58 \pm 26 と上昇を示した。 T_4-I 1.1 γ /dI で臨床的に euthyroid の TBG 欠損症例では D.A.77 と高値を示した。バセドウ病では未治療の 1 例で D.A.304 と極めて高値を示した。また PTU 治療にも拘らず hyperthyroid の 5 例では D.A.101 \pm 23 と有意 ($p < 0.001$) に高値を示した。同じく PTU 治療で euthyroid の 14 例では D.A.24 \pm 20 とほぼ正常域を示した。下垂体性小人症の未治療群 8 例では D.A.18 \pm 14 と正常対象より低い有意差なく、GH 単独又は T_4 併用療法の 5 例では D.A.61 \pm 17 と両者に有意差 ($p < 0.001$) がみられた。

また、血中ホルモン濃度と脱ヨード活性との関係を図 5 に示した。甲状腺疾患群と下垂体性小人症群に分けて血中 T_4 並びに T_3 値との関連をみたが、甲状腺疾患では T_3 値と脱ヨード活性の間に有意の相関 ($r = 0.76$) がみられた。下垂体性小人症では相関はみられなかった。

考 案

I 方法論上の問題点

1. 末梢血リンパ球を用いた脱ヨード活性は、既に Holm らが報告している¹¹⁾が、それによれば当初白血球を用いた成績にバラツキが多いため、途中よりリンパ球に変更している。原法では、リンパ球のホモジネ

 表 2 T_4 deiodinating activity of lymphocytes in vitro

Subjects	Treatment	No. of samples	T_4 deiodinating activity. (Mean \pm SD)
Normal control	(-)	26	26 \pm 14
Hypothyroidism	(-)	2	2.5 \pm 0.5
	with $l-\text{T}_4$	4	58 \pm 26*
TBG deficiency	(-)	1	77*
Graves' disease	(-)	1	304*
	with PTU (clinically hyper)	5	101 \pm 23**
	with PTU (euthyroid)	14	24 \pm 20
Pituitary dwarf	(-)	8	18 \pm 14
	with GH and/or $l-\text{T}_4$	5	61 \pm 17**

P value vs control group; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$.

ートを作成し、細胞内のヨードについても測定しているが、手技が繁雑となり、臨床検査としては不利である。我々も予備実験で細胞内活性を測定したが、メジウム中の活性に比して小さく、結果に大きな影響を及ぼさなかった。よって細胞内の測定は省いたが、これによる大きな成績の変動はないと考えている。

2. 単球の混入: リンパ球分離の際、10%前後の単球の混入は避けられないが、プラスチックシャーレー中にリンパ球を静置し、adherent cellを除いて活性を測定しても大きな変化は見られず、操作も繁雑となり細胞数の損失も大きいいため、単球の分離も略してよいと思われる。

3. Fe^{++} 濃度: Fe^{++} を加えない resting levelでの脱ヨード活性は低く、正常と異常の差の判定が困難であることから、活性化した状態での測定が有利と思われる。しかし、 Fe^{++} 濃度が高い場合、chemicalな脱ヨード化も促進されるので、加える Fe^{++} 濃度は baselineに影響を及ぼさない必要最小限の $0.01\mu\text{M}$ 程度で十分であろうと思われる。リボフラビンも活性を上昇させるが、着色のためメジウムのpHの判定が困難となるので使用を控えた。

4. 血清添加の影響: メジウム中に血清又は蛋白成分が存在すると脱ヨード反応は殆んど進行しない。これはおそらく、 T_4 と蛋白の結合のため、細胞への取り込みが抑えられる結果によると考えられる。従って、測定系は protein free のメジウムであることが必要と思われる。

5. 培養時間: time courseをとると、3時間を過ぎる頃より逆にメジウム中のヨードが低下する現象がみられた。これについては、一旦放出されたヨードが

protein free のメジウム中では T_4 中のヨードと交換反応をおこすという記載¹²⁾があり、おそらくこのために一時的な減少をきたすものと思われる。よって培養時間は2時間以上延長する必要はないと考えられる。

6. Photooxidation: $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ は光により自然に脱ヨード化されることが知られている。従って測定操作は遮光した環境で行なうのが理想的であるが予備実験では、通常の実験室で操作を行ない、培養中も遮光されている限り、大きな変動の要因とはならなかった。

7. pHの影響: T_4 がアルカリ又は酸性下で chemical に脱ヨード化されることはよく知られている。培養時間は2時間であるが、その間メジウムのpHはかなり変動するので、この点の検討が今後さらに必要であると考えられる。

8. O_2 濃度: T_4 の脱ヨード反応には O_2 が関与しており¹³⁾、Holmらは培養前に oxygenationを行なっている。我々は、95% air, 5% CO_2 下で培養を行ない、oxygenationの必要性については検討を加えていない。この点も今後の問題である。

9. $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ の添加量: 当初 resting levelの活性が低いので、クロマトのヨード分画を 10^3cpm 程度に上げるため、メジウム中の T_4 濃度を $8\text{ }\mu\text{g/dl}$ とした。しかし、RI使用量はかなり大量となり、RIを用いる実

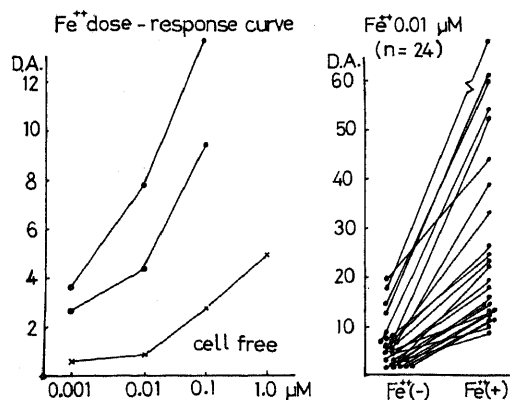


図4 Effect of Fe^{++} on T_4 deiodination

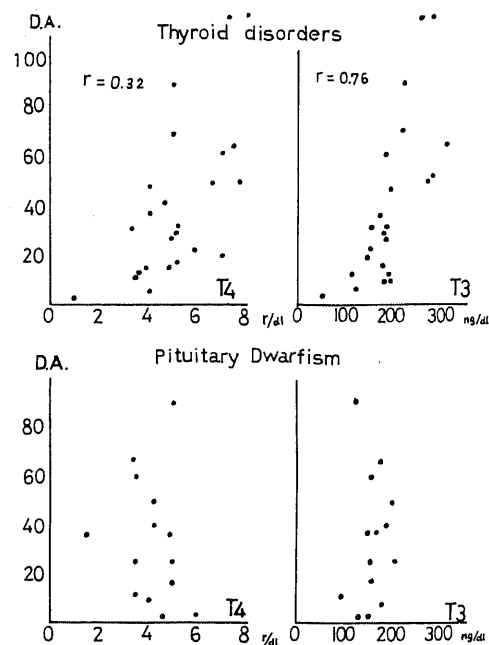


図5 Scattergram of T_4 deiodination activity as a function of serum T_4 and T_3

験としては変則的なので、現在活性を上げて $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ を減らすことを検討中である。予備実験から 1/10 程度に減らすことが可能と考えている。

10. 生体外でのリンパ球の変化:同一測定内の再現性は良好であるが、同一人のリンパ球について反復測定した場合の測定間の再現に変動がかなりみられる。その原因として、生体内での生理的変動も考えうるが、それより、採血からリンパ球分離培養までの経過中に *in vitro* でのリンパ球の状態がどのように変動するかが不明である。今後この点の検討がさらに必要と思われる。

II 臨床的問題点

未治療のクレチン症2例では、脱ヨード活性は殆んど認められず、血中 T_4-I 値の低下とよく一致した。一方TBG欠損例では、 T_4-I 値が低下しているにも拘らず、脱ヨード活性は高値を示した。また、脱ヨード活性と T_4-I 値には相関が認められなかったことより、脱ヨード活性の測定は血中 T_4-I 濃度の測定とはその意義を異にするものと考えられる。一方、脱ヨード活性と血清 T_3 値とは有意の正の相関が認められた。機能亢進状態のバセドウ病では、その病態から、第一編で述べた様に T_3 が高いと考えられ、また末梢での T_4-T_3 系への亢進が予想される。GH治療初期の下垂体性小人症においても T_3 の上昇が認められる為(第一編)、脱ヨード活性の上昇と一致した。従って、これらの事実は、脱ヨード活性は間接的に甲状腺ホルモンの末梢代謝をよく反映していることを示唆する。

第一編の成績から未治療のクレチン症では T_4-T_3 系はむしろ亢進している成績を得たが、totalの脱ヨード活性そのものは、必ずしも T_4-T_3 系の活性を反映するものではないと考えられ、GHによる活性の上昇などからみてむしろ細胞の一般的な代謝活性を反映している可能性が強い。最近、白血球(主に好中球)の T_4 脱ヨード活性を検討した成績では、感染や貧食作用時に活性が上昇することが報告されており⁽¹⁴⁾⁻⁽¹⁶⁾ リンパ球の脱ヨード活性も単に甲状腺ホルモンの末梢代謝の直接的反映と考えるよりは、非特異的な細胞の代謝活性を反映していると考えの方が事実に近いかもしれない。従って今後、全身性疾患や飢餓や、又、ステロイド投与時などの検討がさらに必要であると考えられる。

結 論

末梢血リンパ球脱ヨード活性は、未治療のクレチン症で低く、機能亢進状態のバセドウ病で高く、いずれも治療により正常に回復した。GH投与の下垂体性小

人症では、投与前後で活性の上昇をみた。いずれも臨床症状に一致し、これらのことから、本法は甲状腺ホルモンの末梢代謝作用をよく反映していると考えられる。

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました谷口昂教授に深謝いたします。また終始御指導・御助言をいただいた佐藤保助教授に心から感謝の意を表します。そして御協力いただいた小児科内分泌グループの諸先生に感謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第26回日本内分泌学会東部部会(1978)及び第52回日本内分泌学会(1979)において発表した。

文 献

- 1) Yamazaki, E. & Slingerland, D. W.: The *in vitro* metabolism of thyroxine, triiodothyronine and their acetic and propionic analogues. *Endocrinology*, **64**, 126 - 135 (1959).
- 2) Sprott, W. F. & MacLagan, N. E.: Metabolism of thyroid hormones. The deiodination of thyroxine and triiodothyronine *in vitro*. *Biochem. J.*, **59**, 288 - 294 (1955).
- 3) Kaplan, M. M. & Uciger, R. D.: Iodothyronine metabolism in rat liver homogenates. *J. Clin. Invest.*, **61**, 459 - 471 (1978).
- 4) Oppenheimer, J. H., Koerner, D., Schwartz, H. L. & Surks, M. I.: Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **35**, 330 - 333 (1972).
- 5) Schadow, A. R., Surks, M. I., Schwartz, H. L. & Oppenheimer, J. H.: Specific triiodothyronine binding sites in anterior pituitary of the rat. *Science*, **176**, 1252 - 1254 (1972).
- 6) Tsai, J. S. & Samuels, H. H.: Thyroid hormone action. Demonstration of putative nuclear receptors in human lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **38**, 919 - 922 (1974).
- 7) Böyum, A.: A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, (suppl. 97), **21**, 51 - 76 (1968).
- 8) Suzuki, M., Ishikawa, I., Shimizu, S. & Yamamoto, K.: Photochemical deiodination

of thyroxine by flavin mononucleotide. *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 403-406 (1961).

9) **Tata, J.R.** : Activation of thyroxine deiodinase by ferrous ions and flavin. *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 567-568 (1959).

10) **Ushijima, Y. Suwa, K., & Nakano, M.** : Degradation of thyroxine by microsomal particles from rat liver. II. Purification of Fe^{2+} dependent particles and some of their properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 284-294 (1973).

11) **Holm, A.C. Beraud, T. L., Scazziga, B. R. & Cuttelod, S.** : Human lymphocyte binding and deiodination of thyroid hormones in relation to thyroid function. *Acta Endocrinol.*, **80**, 642-656 (1975).

12) **Tata, J.R.** : Biochemical applications of a newly discovered property of thyroxine. *Ann.*

N. Y. Acad. Sci., **86**, 469-483 (1960).

13) **Kurland, G.S., Krotkov, M.V. & Freedberg, A.S.** : Oxygen consumption and thyroxine deiodination by human leukocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **20**, 35-46 (1960).

14) **Klebanoff, S.J. & Green, W.L.** : Degradation of thyroid hormones by phagocytosing human leukocytes. *J. Clin. Invest.*, **52**, 60-72 (1973).

15) **Woeber, K.A.** : A granule-associated *L*-thyroxine deiodinating system in the human leukocyte. *Endocrinology*, **98**, 802-806 (1976).

16) **Woeber, K.A.** : *L*-triiodothyronine and *L*-reverse-triiodothyronine generation in the human polymorphonuclear leukocyte. *J. Clin. Invest.*, **62**, 577-584 (1978).

Thyroxine deiodinating activity of lymphocytes *in vitro*. Kohki Saida, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University. Kanazawa, 920, Japan. J. Ju-zen Med. Soc., 88, 255-261 (1979).

Abstract T4 deiodinating activity of lymphocytes was studied in 26 normal subjects, 6 patients with cretinism, a patient with T4 binding globulin (TBG) deficiency, 15 patients with Graves' disease and 10 patients with pituitary dwarfism. The normal value (mean \pm SD) was 26 ± 14 . It was low (2) in an untreated patient with cretinism, which increased to 19 after T4 replacement. Four patients with cretinism under long-term T4 substitution and a patient with TBG deficiency showed significantly higher value than the controls (58 ± 26 and 77 respectively, $P < 0.01$). Those in an untreated patient with Graves' disease and in clinically symptomatic hyperthyroid patients were markedly elevated (304 and 101 ± 23 , $P < 0.001$), while those in well-controlled patients with antithyroid medication were within a normal or subnormal range. Children with GH deficiency have low normal activities, whereas in patients treated with hGH significant a rise in T4 deiodination was noted (18 ± 14 vs 61 ± 17 , $P < 0.001$). In thyroidal disorders, a correlation was observed between serum triiodothyronine levels and T4 deiodinating activities ($r=0.76$, $P < 0.01$), but not in pituitary dwarfism. These results appeared to reflect closely the clinical state of the patients, so the method was considered to be suitable for the evaluation of pathophysiologic state of peripheral T4 metabolism in various diseases.